

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 49/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/47538 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01001 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. April 1998 (02.04.98) (30) Prioritätsdaten: 197 17 904.5 23. April 1997 (23.04.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHA, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Weverstrasse 51, D-13595 Berlin (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Jahnstrasse 17, D-13467 Berlin (DE). WRASIDLO, Wolfgang [DE/DE]; Knausstrasse 14, D-14193 Berlin (DE). (74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: ACID-LABILE AND ENZYMATICALLY DIVISIBLE DYE COMPOUNDS FOR DIAGNOSIS WITH NEAR INFRARED LIGHT AND FOR THERAPY (54) Bezeichnung: SÄURELABILE UND ENZYMATISCH SPALTBARE FARBSTOFFKONSTRUKTE ZUR DIAGNOSTIK MIT NAHINFRAROTLICHT UND ZUR THERAPIE (57) Abstract <p>The invention relates to acid-labile and enzymatically divisible compounds for in-vivo and in-vitro diagnosis by means of near infrared radiation (NIR-radiation), the use of said compounds as optic diagnostic and therapeutic agents, and the diagnostic agents containing said compounds.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft säurelabile und enzymatisch spaltbare Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro-Diagnostik mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung), die Verwendung dieser Verbindungen als optische Diagnostika und Therapeutika und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

„Säurelabile und enzymatisch spaltbare Farbstoffkonstrukte zur Diagnostik mit Nahinfrarotlicht und zur Therapie“

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft säurelabile und enzymatisch spaltbare Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro-Diagnostik mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung), die Verwendung dieser Verbindungen als optische Diagnostika und Therapeutika und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.

15 Die Nahinfrarotbildgebung ist ein nicht invasives diagnostisches Verfahren, bei dem die hohe Durchlässigkeit biologischen Gewebes für Licht der Wellenlänge 650-1000 nm ausgenutzt wird. Im Gegensatz zu Licht des ultravioletten und sichtbaren Spektralbereichs, das nur in die obersten Millimeter des Gewebes eindringen kann, werden bei Verwendung von Nahinfrarotlicht Eindringtiefen in Gewebe von bis zu mehreren Zentimetern erzielt. Die Ursachen für die prinzipiell geringe Eindringtiefe von Licht sind die Absorption körpereigener Farbstoffe, hauptsächlich des Hämoglobins und des Wassers, die jedoch im Spektralbereich des Nahinfrarotlichtes zwischen 650 und 1000 nm minimale Werte aufweisen. Dieser spektrale Bereich der größten optischen Gewebetransparenz wird daher auch diagnostisches/therapeutisches Fenster genannt (Boulnois, J., Lasers Med Sci 1986, 1:47-66).

25 Dem Diagnostiker steht hiermit neben den modernen bildgebenden Verfahren, wie Röntgen, Magnetresonanztomographie oder Ultraschalldiagnostik, ein weiteres Verfahren zur bildlichen Gewebedarstellung zur Verfügung (Haller, E.B., Time-resolved transillumination and optical tomography. J Biomed Optics 1996, 1:7-17).

- Die Verwendung von NIR-Strahlung zur ortsabhängigen Aufzeichnung von Blutfluß und Oxygenierungsgrad im Gehirn von Säuglingen durch die Detektion der Absorption von Hämoglobin/Deoxyhämoglobin ist ein seit Jahren bekanntes und angewandtes Verfahren (Jöbsis, F.F., Science 1977, 198:1264-67; Chance, B., Leigh, J.S., Miyake, H. et al., Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:4971-75; Benaron D.A. et al., Science 1993, 33: 369A.).
- 10 Das wesentliche Problem bei der Nutzung von nahinfraroter Strahlung ist die starke Streuung des Lichtes, so daß selbst bei unterschiedlichen photophysikalischen Eigenschaften von einem scharf begrenzten Objekt und seiner Umgebung sich dieses Objekt nur unscharf abzeichnet. Das
- 15 Problem nimmt mit wachsender Entfernung des Objektes von der Oberfläche zu und kann als hauptsächlicher limitierender Faktor sowohl bei der Transillumination als auch bei der Detektion von Fluoreszenzstrahlung angesehen werden. Deshalb können Farbstoffe als Kontrastmittel, die
- 20 die optischen Eigenschaften der Gewebe prägen und zu einer erhöhten Absorption und Fluoreszenz der zu detektierenden Gewebe führen, auch bei geringer Ortsauflösung eine eindeutige Detektion ermöglichen. Dabei kann das Absorptionsverhalten solcher
- 25 Farbstoffverbindungen als bildgebende Information ausgenutzt werden. Besitzen die Farbstoffe darüberhinaus die Eigenschaft, die absorbierte Energie als Fluoreszenzstrahlung zu emittieren, so kann diese ebenfalls als bildgebende Information genutzt werden.
- 30 Hierbei wird die gegenüber der Anregungsstrahlung rotverschobene Fluoreszenzstrahlung gesondert detektiert. Der Vorteil besteht u. a. darin, daß das Gewebe selbst im NIR-Bereich eine äußerst geringe Eigenfluoreszenz aufweist und somit der Untergrund minimal ist.

(S. Folli et al., Cancer Research 54, 2643-9 (1994); B. Ballou et al., Cancer Immunol. Immunother. 41, 257-63 (1995); X. Li et al., SPIE Vol. 2389, 789-98 (1995)).

5 In der Fluoreszenzdiagnostik ist die Voraussetzung dafür eine ausreichende, möglichst hohe Differenz in der Fluoreszenzemission zwischen zu detektierendem und umliegendem Gewebe. Dies kann prinzipiell durch eine Differenz in der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes
10 zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Substanzapplikation erreicht werden. Insbesondere für die Diagnostik in tieferen Gewebeschichten ist diese Differenz bei der Verwendung von Substanzen mit unspezifischem Anreicherungsverhalten oft nicht ausreichend.

15 Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen zur Verfügung zu stellen, welche die Nachteile des Standes der Technik überwinden.

20 Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



25 gelöst, worin

F für ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm steht,

30 L für eine Linkerstruktur, welche eine säurelabile und/oder enzymatisch spaltbare Bindung enthält, steht,

m eine Zahl zwischen 1 und 80 ist,

35

wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 1 und 3 ist,

- 5 A ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem
Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm, ein
antibiotisch oder antizytostatisch wirksames
Molekül, ein Biomolekül, ein nicht biologisches
Makromolekül oder eine Verbindung B-(L-W)_o oder
D-(L-W)_o darstellt, wobei
- 10 D ein nicht biologisches Makromolekül ist,
B ein Biomolekül ist,
L die oben genannte Bedeutung hat,
W ein antibiotisch oder antizytostatisch wirksames
Molekül darstellt,
- 15 o eine Zahl zwischen 1 und 20 ist,

und wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 4 und 80
ist,

- 20 A ein Biomolekül, ein nicht biologisches Makromolekül
oder eine Verbindung B-(L-W)_o oder D-(L-W)_o.
darstellt, wobei

D, B, L, W und o die oben genannten Bedeutungen haben.

25

- Die besondere Eigenschaft hinsichtlich der In-vivo-
Detektion der nahinfraroten Fluoreszenzemission der
erfindungsgemäßen Verbindungen besteht darin, daß diese
eine geringe bis gar keine Fluoreszenzemission aufweisen
30 und erst nach Spaltung dieses Konstruktes bzw. Abspaltung
des Farbstoffes vom Konstrukt am Zielort (z. B. Tumor,
Entzündungen) eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals
auftritt. Die effektive Differenz des Fluoreszenzsignals
zwischen zu detektierendem und umliegenden Gewebe wird
35 demzufolge durch

- a) die Konzentrationsdifferenz aufgrund pharmakokinetischer Mechanismen und
- b) durch die Differenz in der Fluoreszenzquantenausbeute zum Zeitpunkt der Diagnostik

5 geprägt.

Es wurde gefunden, daß die Fluoreszenz der Farbstoffe gequenchet wird, wenn ein Farbstoffmolekül an ein weiteres Molekül (Dimere) unter Erhalt der erfindungsgemäßen
10 Verbindungen gekoppelt ist, d. h. es tritt eine äußerst geringe Fluoreszenzemission im Vergleich zum entsprechenden Farbstoffmolekül im ungebundenen Zustand auf. Es wurde darüberhinaus gefunden, daß ein vergleichbares Quenching auftritt, wenn andere Moleküle
15 mit aromatischen Strukturen, welche sowohl Farbstoffe als auch Wirkstoffe (z. B. Zytostatika oder Antibiotika) sein können, mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Überraschenderweise tritt ebenso ein Quenching bei
Kopplung der Farbstoffe an Antikörper,
20 Antikörperfragmente und Proteine auf.

Grundsätzlich müssen sich die Farbstoffe, die struktureller Bestandteil der erfindungsgemäßen Verbindungen sind, in ihrer monomeren unkonjugierten Form
25 durch hohe molare Absorptionskoeffizienten und hohe Fluoreszenzquantenausbeuten auszeichnen.

30

35

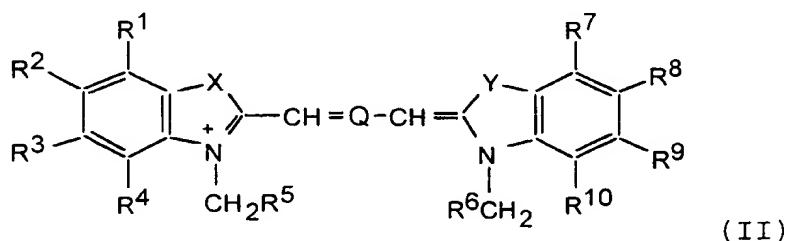
Bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen
Formel I zeichnen sich dadurch aus, daß F und/oder A für
5 einen

Polymethinfarbstoff, Tetrapyrrolfarbstoff,
Tetraazapyrrolfarbstoff, Xanthinfarbstoff,
Phenoxazinfarbstoff oder Phenothiazinfarbstoff
10 stehen.

Besonders bevorzugt sind die Strukturen aus der Klasse
der Polymethinfarbstoffe, da diese Absorptionsmaxima mit
sehr hohen molaren Absorptionskoeffizienten im
15 nahinfraroten Spektralbereich zwischen 700 und 1000 nm
aufweisen (ϵ bis zu $300000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), wie
beispielsweise Cyaninfarbstoffe, Squariliumfarbstoffe und
Croconiumfarbstoffe, sowie Merocyanin- und
Oxonolfarbstoffe.

20 Ferner sind solche erfindungsgemäßen Verbindungen der
allgemeinen Formel (I) bevorzugt, bei denen F und/oder A
für einen

25 Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel II



30 stehen,
worin

R¹ bis R⁴ und R⁷ bis R¹⁰ unabhängig voneinander für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹,
5 -E¹,

wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C₁-C₅₀-Alkylkette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette
10 gegenbenenfalls eine oder mehrere aromatische oder gesättigte zyklische C₅-C₆- oder bizyklische C₁₀-Einheiten formen können, steht, und wobei die C₁-C₅₀-Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen
15 ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen, 0 bis 5 Estergruppen, 0 bis 3 Carboxylgruppen, 0 bis 3 Aminogruppen, substituiert ist,

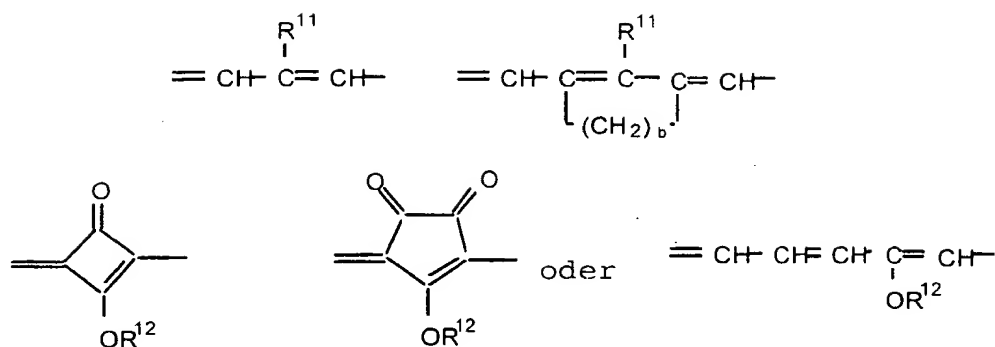
und wobei jeweils benachbarte Reste R₁ - R₄ und/oder
20 R₇ - R₁₀ unter Bildung eines sechsgliedrigen aromatischen Kohlenstoffringes miteinander verknüpft sein können,

R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander für einen Rest -E¹ mit der oben angegebenen Bedeutung oder für eine C₁-
25 C₄-Sulfoalkylkette stehen,

und/oder R¹ bis R¹⁰ für eine Verknüpfung mit L stehen,

Q ein Fragment

30



ist,

worin

5 R¹¹ für ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder einen Rest -NE¹E², -OE¹ oder -E¹, wobei E¹ und E² die oben angegebene Bedeutung haben oder für eine Verknüpfung mit L steht,

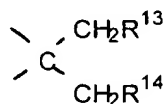
10

R¹² für ein Wasserstoffatom oder einen Rest E¹ mit der oben angegebenen Bedeutung steht,

b eine Zahl 0, 2 oder 3 bedeutet,

15

X und Y unabhängig voneinander O, S, -CH=CH- oder ein Fragment



20

darstellt,

worin

25

R¹³ und R¹⁴ unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C₁ - C₁₀-Alkylkette, die durch bis zu 5 Sauerstoffatome unterbrochen und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert

sein kann, stehen, und wobei die Reste R^{13} und R^{14} unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sein können.

5 Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), in denen Farbstoffe mit einem therapeutisch wirksamen Molekül über eine physiologisch spaltbare Bindung verknüpft sind, oder Farbstoff und
10 Wirkstoff über physiologisch spaltbare Bindungen an Biomoleküle oder nicht biologische Trägermoleküle gekoppelt sind.

Besonders bevorzugt sind Konstrukte, bei denen die Fluoreszenz des Farbstoffes im gekoppelten Zustand
15 gequencht und die therapeutische Aktivität des Wirkmoleküls durch die Kopplung an Farbstoff bzw. Trägermolekül maskiert ist (Pro-Drug-Effekt). Die Spaltung der Bindung führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenzemission bei gleichzeitiger Freisetzung der
20 Aktivität des Wirkstoffes.

Wirkstoffe W und/oder A in der erfindungsgemäßen allgemeinen Formel (I) sind beispielsweise die im
folgenden aufgeführten Verbindungen:

25 Antibiotika: Aclacinomycin, Actinomycin F_1 , Anthramycin, Azaserin, Bleomycine, Cactinomycin, Carubicin, Carzinophilin, Chromomycine, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Mtiomycine, Mycophenolsäure,
30 Nogalamycin, Olivomycine, Peplomycin, Plicamycin, Porfiromycin, Puromycin, Streptonigrin, Tubercidin, Zorubicin,
Folsäure-Analoga: Denopterin, Metothrexat, Pteropterin, Trimetrexat,

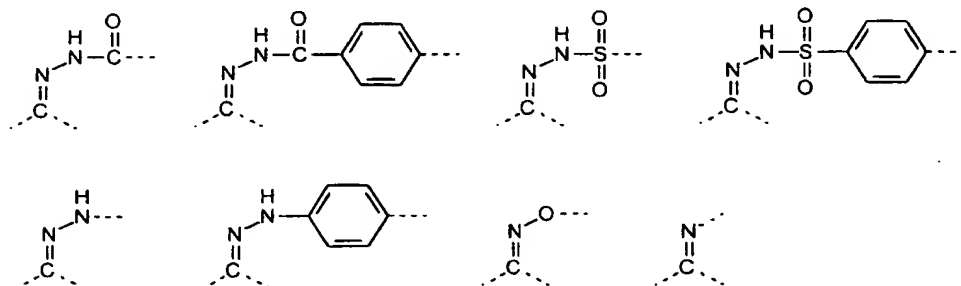
- Pyrimidin-Analoga: Ancitabin, Azacitidin, 6-Azaauridin, Carmofur, Cytarabin, Doxifluridin, Enocitabin, Floxuridin, 5-Fluor-Uracil,
Purin-Analoga: Fludarabin, 6-Mercaptopurin, Thiamiprin,
5 Thioguanin und Derivate der genannten Verbindungen,
alkylierende Substanzen: Alkylsulfonate, Aziridine, Ethylenimine, Methylmelamine, Nitroharnstoffe, Stickstofflostverbindungen,
hormonell wirksame Substanzen wie Androgene,
10 Antiadrenale, Antiandrogene, Antiestrogene, Estrogene, LH-RH-Analoga und Progestogene,
sowie weitere zytostatisch wirksame Substanzen, wie Taxol und Taxol-Derivate.
- 15 Weitere Wirkstoffe sind photodynamisch aktive Substanzen, die sich durch das Vermögen auszeichnen, nach Anregung eine photosensibilisierende Wirkung durch Bildung zytotoxischen Singulett-Sauerstoffs und von Radikalen entfalten. Solche Verbindungen sind in erster Linie
20 Tetrapyrrole bzw. Tetraazapyrrole, beispielsweise Porphyrine, Benzoporphyrine, Chlorine, Purpurine, Phthalocyanine, Naphthalocyanine und Derivate der genannten Verbindungen. Weitere Verbindungen sind expandierte Porphyrine, Porphycene und Oxazin- bzw.
25 Phenoxazinfarbstoffe.

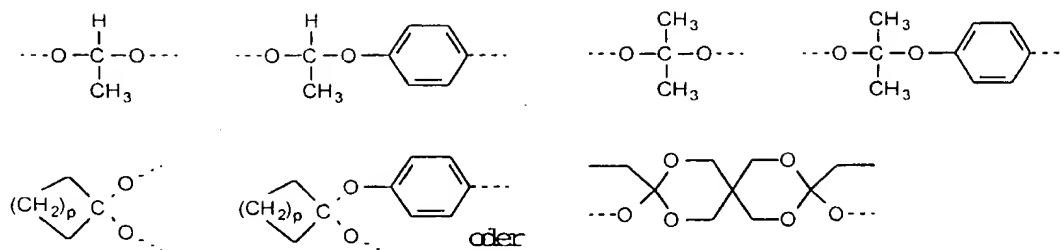
Die chemische Bindung, die gemäß der allgemeinen Formel (I) in der Linkerstruktur L enthalten ist, ist strukturell derart beschaffen, daß diese bei bestimmten
30 physiologischen Parametern, durch die erkrankte Gewebe (Tumoren) charakterisiert sind und welche sich von normalen Gewebebereichen unterscheiden, gespalten wird.

Es ist in der Literatur beschrieben, daß Tumore durch
35 geringere pH-Werte im Vergleich zu Normalgewebe charakterisiert sind. Während der intrazelluläre pH-Wert

weitgehend identisch ist (ca. pH 7.4) ist der extrazelluläre pH-Wert in Tumoren um bis zu 0.5 pH-Einheiten erniedrigt. Auch Entzündungen, insbesondere bakterieller Art, sind durch erniedrigte pH-Werte gekennzeichnet. Die Methoden zur Bestimmung der pH-Werte sind u. a. Messungen mit Mikroelektroden, Fluoreszenzmessungen mit pH-sensitiven Fluoreszenzproben und Messungen mit MR-Sonden (R. J. Gillies et al., Am. J. Physiol. 267, pC 195-203 (1994), G. R. Martin und R. K. Jain, Microvascular Research 46, 216-230 (1993), L. E. Gerweck und K. Seetharaman, Cancer Research 56, 1194-1198 (1996)), K. Engin et al., Int. J. Hyperthermia 11(1995) 211-216, K. Engin et al., Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 29 (1994) 125-132, G. Helmlinger et al., Nature Medicine 3 (1997) 177-182.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen mit Linkerstrukturen L, die durch erniedrigte physiologische pH-Werte gespalten werden. Solche Strukturen sind beispielsweise Alkylhydrazone, Acylhydrazone, Arylhydrazone, Sulfonylhydrazone, Imine, Oxime, Acetale, Ketale, Orthoester entsprechend den Fragmenten





worin p für eine Zahl zwischen 2 und 4 steht.

- 5 Die Spaltung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann neben der Spaltung aufgrund erniedrigter pH-Werte auch durch Enzyme, die in den zu detektierenden Geweben (z. B. Tumoren, bakterielle Entzündungen) in erhöhter Konzentration vorliegen, erfolgen.

10

- Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen mit Linkerstrukturen L, die enzymatisch gespalten werden. Enzymatisch spaltbare Linkerstrukturen sind beispielsweise solche, die durch Kathepsine, Peptidasen, Carboxypeptidasen, α - und β -Glukosidasen, Lipasen, Oxidasen, Phospholipasen, Phosphatasen, Phosphodiesterasen, Proteasen, Elastasen, Sulfatasen, Reduktasen, Transferasen und bakterielle Enzyme, beispielsweise Penicillin-Amidasen sowie β -Lactamasen, gespalten werden (P. D. Senter et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995), 389-94).

20

- Bevorzugte enzymatisch spaltbare Strukturen sind kurzkettige Peptidsequenzen, wie beispielsweise Sequenzen, die die Aminosäuresequenz Val-Leu-Lys enthalten.

25

- Die Kinetik, die zu einer Anreicherung im zu detektierenden Gewebe bzw. zu einem entsprechenden Konzentrationsgradienten zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Applikation führt, muß sowohl mit der Kinetik der

30

Spaltung der erfindungsgemäßen Verbindungen als auch der Kinetik des Abtransportes des freigesetzten Farbstoffmoleküls korrelieren und zu einem synergistischen Effekt führen.

5

Weitere bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zeichnen sich dadurch aus, daß A und/oder B für einen Antikörper, deren Konjugate und Fragmente, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, natürliche oder synthetische Ribonukleinsäuren oder Desoxyribonukleinsäuren oder deren chemische Modifikationen, wie Aptamere oder Antisenseoligonukleotide, Lipoproteine, Lectine, Kohlenhydrate, Mono-, Di- oder Trisaccharide, lineare oder verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder -saccharidderivate oder für ein Dextran steht.

10

Ferner sind die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bevorzugt, in denen D Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polylysin oder Polylysin-Dendrimere oder deren Derivate darstellen.

20

Die Verknüpfung der Strukturelemente A, D, B, L und W erfolgt entweder direkt oder über übliche funktionelle Gruppen. Solche Gruppen sind beispielsweise Ester, Ether, sekundäre und tertiäre Amine, Amide, Thioharnstoff-, Harnstoff-, Carbamatgruppen oder Maleimidostrukturen.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I zur In-vivo-Diagnostik erkrankter Gewebebereiche mittels NIR-Strahlung sowie zur Therapie erkrankter Gewebebereiche.

30

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein optisches Diagnostikum zur In-vivo-Diagnostik erkrankter

35

Gewebebereiche mittels NIR-Strahlung, welches mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthält.

5 Diese Mittel werden nach den dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt, ggf. unter Verwendung üblicher Hilfs- und/oder Trägerstoffe sowie Verdünnungsmittel und dergleichen. Dazu gehören physiologisch verträgliche Elektrolyte, Puffer, Detergenzien und Substanzen zur
10 Anpassung der Osmolarität sowie zur Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit. Durch die in der Pharmazie gebräuchlichen Maßnahmen ist für die Sterilität der Zubereitungen bei der Herstellung und insbesondere vor der Applikation zu sorgen.

15

Die Synthese der Farbstoffe F und A erfolgt nach literaturbekannten Methoden, z. B.

F.M. Hamer in The Cyanine Dyes and Related Compounds,
20 John Wiley and Sons, New York, 1964;
J. Fabian et al., Chem. Rev. 92 (1992) 1197;
L.A. Ernst et al., Cytometrie 10 (1989) 3-10;
P.L. Southwick et al., Cytometrie 11 (1990) 418-430;
R. B. Mujumdar et al., Bioconjugate Chem. 4 (1993) 105-11;
25 E. Terpetschnig et al., Anal. Biochem. 217 (1994) 197-204;
J. S. Lindsey et al., Tetrahedron 45 (1989) 4845-66,
EP-0591820 A1;
L. Strekowski et al., J. Heterocycl. Chem. 33 (1996)
1685-1688;
30 S. R. Mujumdar et al., Bioconjugate Chem. 7 (1996) 356-362;
M. Lipowska et al., Synth. Commun. 23 (1993) 3087-94;
E. Terpetschnig et al., Anal. Chim. Acta 282 (1993) 633-641;

35

M. Matsuoka und T. Kitao, Dyes Pigm. 10 (1988) 13-22 und
N. Narayanan und G. Patronay, I. Org. Chem. 60 (1995)
2361-95.

5 Die Farbstoffe werden in Anlehnung an literaturbekannte
Methoden mit Substituenten synthetisiert, die säurelabile
oder enzymatisch spaltbare Bindungen enthalten oder aus
denen solche Bindungen nach Kopplung entstehen; z. B.
nach

10

B. M. Mueller et al., Bioconjugate Chem. 1 (1990) 325-
330;

K. Srinivasachar und D. M. Neville, Biochemistry 28 (1989)
2501-09;

15

D. M. Neville et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 14653-61;

T. Kaneko et al., Bioconjugate Chem. 2 (1991), 133-41;
B. A. Froesch et al., Cancer Immunol. Immunother. 42
(1996), 55-63 und

J. V. Crivello et al., J. Polymer Sci: Part A: Polymer

20

Chem. 34 (1996) 3091-3102.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiele:

25

1. Synthese von 5-(1-Oxoethyl)-1,1'-(4-sulfoethyl)-
indotricarbocyanin-natriumsalz 1 (Figur 1)

30

4-Hydrazinophenylmethylketon wird aus 4-Aminophenyl-
methylketon durch Diazotierung und Reduktion mit SnCl₂
synthetisiert (in Anlehnung an T. Górecki et al., J.
Heterocyclic Chem. 33 (1996) 1871-76).

4,8 g (32 mmol) 4-Hydrazinophenylmethylketon, 5,4 g
Natriumacetat und 3,9 g (45 mmol) 3-Methyl-2-butanon

35

werden in 40 ml Essigsäure 1 h bei Raumtemperatur und 4 h
bei 120°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Vakuum

- eingedampft, in 300 ml Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 erhält man 7,5 g eines braunen Öls. Dieses wird mit 6,5 g (48 mmol) 1,4-Butansulton 5 h auf 140°C erhitzt, nach dem Abkühlen mit Aceton verrührt und der ausgefallene Feststoff chromatographisch (RP C-18, Laufmittel Methanol/Wasser) gereinigt. Ausbeute: 2,5 g (23%) 5-(1-Oxoethyl)-1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin **2**.
- 10 Zur Darstellung des Farbstoffes **1** werden 0,5 g (1,7 mmol) 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin **3** mit 0,47 g (1,6 mmol) Glutaconaldehyddianilhydrochlorid in 10 ml Essigsäureanhydrid 30 min bei 120°C gerührt. Nach Abkühlen wird mit 0,6 g (1,8 mmol) **2**, 10 ml
- 15 Essigsäureanhydrid, 4 ml Essigsäure und 0,5 g Natriumacetat versetzt und 30 min auf 120°C erhitzt. Die tiefblaue Lösung wird abgekühlt, mit 200 ml Ether verrührt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Nach chromatographischer Reinigung (RP C-18, Laufmittel
- 20 Methanol/Wasser) und Gefriertrocknung erhält man 0,3 g (26%) Produkt **1**.

Elementaranalyse:

- Ber.: C 61,99 H 6,33 N 3,91 S 8,95
- 25 Gef.: C 61,73 H 6,49 N 3,80 S 8,78

Absorption: λ_{max} (H_2O) = 748 nm ($\epsilon = 148000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

30 2. Modifizierung mit säurelabilen Linkern (Figur 2)

2.1. Umsetzung von **1** mit 4-Carboxyphenylsulfonylhydrazin

- 0,2 g (0,28 mmol) **1** und 74 mg (0,34 mmol) 4-Carboxyphenylsulfonylhydrazin werden in 20 ml Methanol gelöst,
- 35 mit 5 μl Trifluoressigsäure versetzt und 18 h bei Raum-

temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum verdampft, der Rückstand mehrfach mit Dichlormethan gewaschen und das Produkt getrocknet. Ausbeute: 0,21 g **4**.

5 2.2. Umsetzung von **1** mit 4-Aminobenzoessäurehydrazid

0,2 g (0,28 mmol) **1** und 51 mg (0,34 mmol) 4-Aminobenzoessäurehydrazid werden analog 2.1 umgesetzt. Ausbeute: 0,20 g **5**.

10

2.3. Umsetzung von **1** mit 4-(Aminomethyl)benzoessäurehydrazid

0,2 g (0,28 mmol) **1** und 56 mg (0,34 mmol) 4-Aminomethylbenzoessäurehydrazid werden analog 2.1 umgesetzt. Ausbeute: 0,22 g **6**.

15

3. Erzeugung reaktiver funktioneller Gruppen
(N-Hydroxysuccinimidester und Isothiocyanat) (Figur 2)

20

Zur Darstellung der entsprechenden N-Hydroxysuccinimidylesterverbindung **7** werden 0,1 g (0,1 mmol) **4** mit 14 mg (0,12 mmol) N-Hydroxysuccinimid (NHS) in 12 ml Dimethylformamid (DMF) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 23 mg (0,11 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 1 ml DMF versetzt. Nach 72 h Rühren wird das Produkt durch mit Diethylether ausgefällt, abfiltriert und erneut aus DMF/Diethylether umgefällt. Das nach Vakuumtrocknung erhaltene Produkt (12 mg) wird ohne weitere Reinigung verwendet.

30

Zur Darstellung der säurelabilen Isothiocyanatverbindung **8** werden 0,1 g (0,11 mmol) **5**, 33 mg (0,14 mmol) N,N'-Thiocarbonyldi-2(1H)-pyridon und 15 mg (0,15 mmol) Triethylamin in 15 ml Chloroform 60 min. bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wird mit Diethylether

35

ausgefällt, abfiltriert und mittels HPLC gereinigt (RP Select B, Merck, Laufmittel 10mM Phosphatpuffer pH8 / Methanol). Man erhält 40 mg (40%) **8** nach Gefriertrocknung, Abtrennung der Salze mit
5 Dichlormethan/Methanol und Trocknung im Vakuum.

4. Labeling von mAK 9.2.27 (Anti-Melanom-Antikörper)

10 4.1. Labeling mit säurelabilem NHS-Ester **7**

1 mg Antikörper in 0,5 ml 50mM Boratpuffer (pH 9,2) wird mit 33 µl **7** (Stammlösung 5 mmol/l in DMF) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Ungebundener Farbstoff
15 wird über NAP-5-Säulen abgetrennt (Elution mit 25 mM Phosphatpuffer pH 7,8, +0,01% NaN₃). Das Produkt mAK9.2.27/**4**-Konjugat wird in Lösung bei 4°C aufbewahrt.

VIS/NIR-Absorptionspektrum von mAK9.2.27/**4**-Konjugat (in
20 Phosphatpuffer pH 7,8) siehe Figur 5.

Fluoreszenzquantenausbeute $Q = 0,1 \%$ (5 µmol/l in Phosphatpuffer pH 7,8; bezogen auf Indocyaningrün als
25

30

35

Standard mit $Q = 13 \%$ in DMSO nach R.C. Benson und H.A. Kues, J. of Chemical and Engineering Data 22 (1977) 379)

5 4.2. Labeling mit säurelabilem Isothiocyanat **8**

1 mg Antikörper in 0,5 ml 50mM Boratpuffer (pH 9,2) wird mit 6 μ l **8** (Stammlösung 5 mmol/l in DMF) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Ungebundener Farbstoff
10 wird über NAP-5-Säulen abgetrennt (Elution mit 25 mM Phosphatpuffer pH 7,4, +0,01% NaN₃). Das Produkt mAK9.2.27/5-Konjugat wird in Lösung bei 4°C aufbewahrt.

15 5. Synthese von dimeren Indotricarbocyaninfarbstoffen

5.1. Darstellung des symmetrischen Spirodimers **10**
(Figur 3)

20 0,1 g (0,47 mmol) 3,9-Diethyliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro-[5.5]undecan (nach M. Crivello et al., J. Polymer Sci.: Part A: Polymer Chem. 34 (1996) 3091-3102 synthetisiert) und 0,11 g (0,94 mmol) 6-Amino-1-hexanol werden in 15 ml Diethylether 24 h bei Raumtemperatur gerührt und das
25 Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wird an der Ölpumpe getrocknet und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

0,2 g (0,28 mmol) 5-Carboxy-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)-indotricarbocyanin-natriumsalz **9** werden in 15 ml Dichlormethan zusammen mit 0,09 g (0,28 mmol) TBTU und 30 mg
30 Triethylamin 30 min gerührt und mit 0,06 g (0,14 mmol) o. g. Spiroverbindung in 2 ml Dichlormethan versetzt. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt und chromatographisch gereinigt
35 (RP C-18, Laufmittel Methanol/10 mM Phosphatpuffer pH 8). Nach Gefriertrocknung werden die Salze mit

Methanol/Dichlormethan ausgefällt. Man erhält 68 mg (26%) Produkt **10**.

5 VIS/NIR-Absorptionspektrum von **10** (5 µmol/l in Phosphatpuffer pH 8) siehe Figur 6.

10 Fluoreszenzquantenausbeute $Q = 0,2 \%$ (5 µmol/l in Phosphatpuffer pH 8; bezogen auf Indocyaningrün als Standard, siehe Beispiel 4.1.).

5.2. Darstellung eines Farbstoffdimers (**11**) mit säurelabilem Hydrazonlinker aus **6** (Figur 4)

15 0,1 g (0,14 mmol) 5-Carboxy-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)-indotricarbocyanin-natriumsalz **9** werden in 10 ml DMF zusammen mit 45 mg (0,14 mmol) TBTU und 15 mg Triethylamin 30 min gerührt und mit 0,14 g (0,16 mmol) **6**
20 in 2 ml DMF versetzt. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur wird das Produkt durch Zugabe von Diethylether auskristallisiert, abfiltriert und chromatographisch gereinigt (RP C-18, Laufmittel Methanol / 10 mM Phosphatpuffer pH 8). Nach Gefriertrocknung werden die
25 Salze mit Methanol/Dichlormethan ausgefällt. Man erhält 0,13 g (59%) **11**.

VIS/NIR-Absorptionspektrum von **11** (4 $\mu\text{mol/l}$) in Phosphatpuffer pH 8,0 und in Phosphatpuffer pH 6,0 nach 24 h bei 37°C: siehe Figur 7.

5

6. Messung der Fluoreszenzquantenausbeute von **11** bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von der Zeit

10 Lösungen der Konzentrationen 4 $\mu\text{mol/l}$ in 50 mM
Phosphatpuffer der pH-Werte 7,4; 7,0; 6,6; 6,0 und 5,0
werden bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten
werden Aliquots entnommen und die Fluoreszenzquanten-
ausbeuten bestimmt (SPEX Fluorolog Spektralfluorometer,
15 400 W Xe-Lampe, PM958-Detektor, kalibriert auf
wellenlängenabhängige Empfindlichkeit des Detektors,
Werte bezogen auf Indocyaningrün, siehe Beispiel 4.1.).

20

25

30

35

Die Beobachtung der Spaltung des säurelabilen Dimers **11** anhand des Anstiegs Fluoreszenzquantenausbeute bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von der Zeit ist in Figur 8 gezeigt.

7. Synthese eines Doxorubicin-Indotricarbocyanin-Konjugates (**13**) mit säurelabilem Hydrazonlinker (Figur 4)

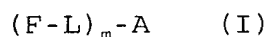
20 mg (34 μmol) Doxorubicin-hydrochlorid und 11 mg (68 μmol) 4-(Aminomethyl)benzoesäurehydrazid werden in 3 ml wasserfreiem Methanol nach Zugabe von 2 μl Trifluoressigsäure 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt **12** wird mit Acetonitril auskristallisiert, abzentrifugiert, mit Acetonitril gewaschen und getrocknet, Ausbeute 18 mg (24 μmol) Rohprodukt. 14 mg (20 μmol) 5-Carboxy-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)-indotricarbocyanin-natriumsalz **9** werden in 0,5 ml DMF zusammen mit 7 mg (22 μmol) TBTU und 20 μl Triethylamin 30 min gerührt. Dieses Reaktionsgemisch wird tropfenweise bei 0°C zu einer Lösung von o. g. **12** (18 mg in 0,2 ml DMF) gegeben und 3 h bei 0°C gerührt. Das Produkt wird durch Zugabe von Diethylether ausgefällt und analog

Beispiel 5 chromatographisch gereinigt. Man erhält 12 mg
(47%) **13**.

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I

5



worin

10

F für ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm steht,

15

L für eine Linkerstruktur, welche eine säurelabile und/oder enzymatisch spaltbare Bindung enthält, steht,

m eine Zahl zwischen 1 und 80 ist,

20

wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 1 und 3 ist,

25

A ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm, ein antibiotisch oder antizytostatisch wirksames Molekül, ein Biomolekül, ein nicht biologisches Makromolekül oder eine Verbindung B-(L-W)_o oder D-(L-W)_o darstellt, wobei

30

D ein nicht biologisches Makromolekül ist,

B ein Biomolekül ist,

L die oben genannte Bedeutung hat,

W ein antibiotisch oder antizytostatisch wirksames Molekül darstellt,

35

o eine Zahl zwischen 1 und 20 ist,

und wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen
4 und 80 ist,

A ein Biomolekül, ein nicht biologisches
Makromolekül oder eine Verbindung B-(L-W)_o oder
D-(L-W)_o darstellt, wobei

D, B, L, W und o die oben genannten Bedeutungen
haben.

10

15

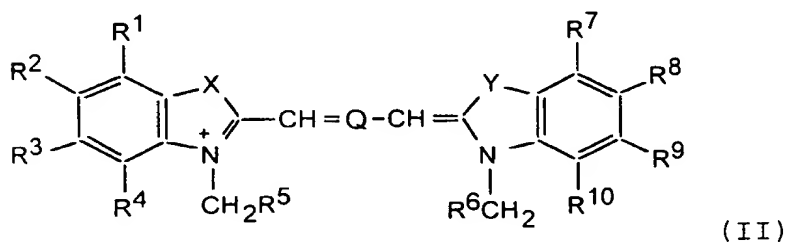
2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß in den allgemeinen Formeln (I) F und/oder A für
einen Polymethinfarbstoff, Tetrapyrrolfarbstoff,
Tetraazapyrrolfarbstoff, Xanthinfarbstoff,
Phenoxazinfarbstoff oder Phenothiazinfarbstoff
stehen.

20

3. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der
allgemeinen Formel (I) F und/oder A für einen
Cyanin-, Squarilium-, Croconium-, Merocyanin- oder
Oxonolfarbstoff stehen.

25

4. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der
allgemeinen Formel (I) F und/oder A für einen
Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel (II)



30

stehen,

worin

R¹ bis R⁴ und R⁷ bis R¹⁰ unabhängig voneinander für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹,
-NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹,
-E¹,

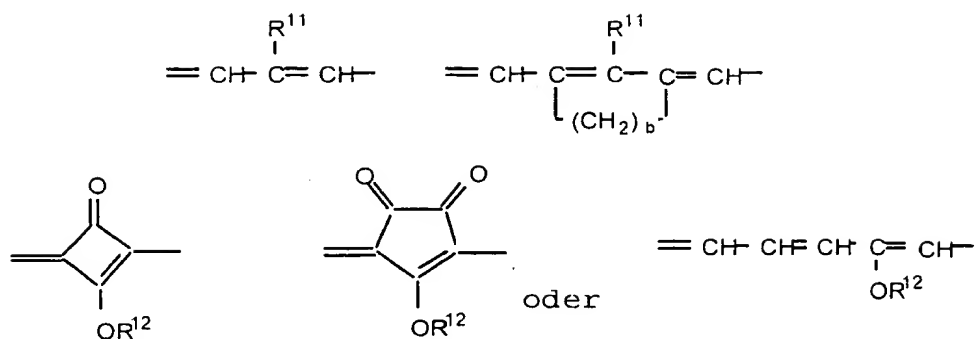
wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C₁-C₅₀-Alkylkette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette gegenbenenfalls eine oder mehrere aromatische oder gesättigte zyklische C₅-C₆- oder bizyklische C₁₀-Einheiten formen können, steht, und wobei die C₁-C₅₀-Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen, 0 bis 5 Estergruppen, 0 bis 3 Carboxygruppen bzw. 0 bis 3 Aminogruppen substituiert ist,

und wobei jeweils benachbarte Reste R₁ - R₄ und/oder R₇ - R₁₀ unter Bildung eines sechsgliedrigen aromatischen Kohlenstoffringes miteinander verknüpft sein können,

R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander für einen Rest -E¹ mit der oben angegebenen Bedeutung oder für eine C₁-C₄-Sulfoalkylkette stehen, und/oder R¹ bis R¹⁰ für eine Verknüpfung mit L stehen,

Q ein Fragment

27



ist,

worin

5 R^{11} für ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder einen Rest $-\text{NE}^1\text{E}^2$, $-\text{OE}^1$ oder $-\text{E}^1$, wobei E^1 und E^2 die oben angegebene Bedeutung haben oder für eine Verknüpfung mit L steht,

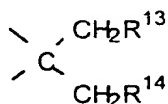
10

R^{12} für ein Wasserstoffatom oder einen Rest E^1 mit der oben angegebenen Bedeutung steht,

b eine Zahl 0, 2 oder 3 bedeutet,

15

X und Y unabhängig voneinander Reste O, S, $-\text{CH}=\text{CH}-$ oder ein Fragment



20

darstellen,

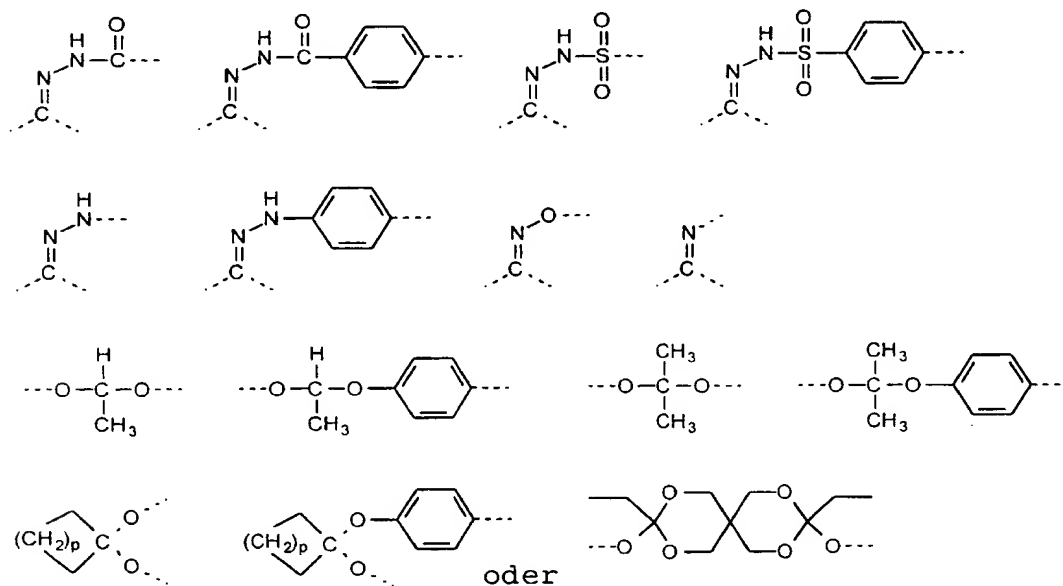
worin

25

R^{13} und R^{14} unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ -Alkylkette, die durch bis zu 5 Sauerstoffatome unterbrochen und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann, stehen, und wobei die Reste R^{13} und

R¹⁴ unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sein können.

5. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) W oder A für Antibiotika, Folsäure-Analoga, Pyrimidin-Analoga, Purin-Analoga, hormonell wirksame Substanzen sowie weitere cytostatisch wirksame Substanzen stehen.
6. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) L für eine Struktur steht, welche ein säurelabiles Fragment



20

worin p für eine Zahl zwischen 2 und 4 steht, enthält.

7. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) L für eine Struktur steht,

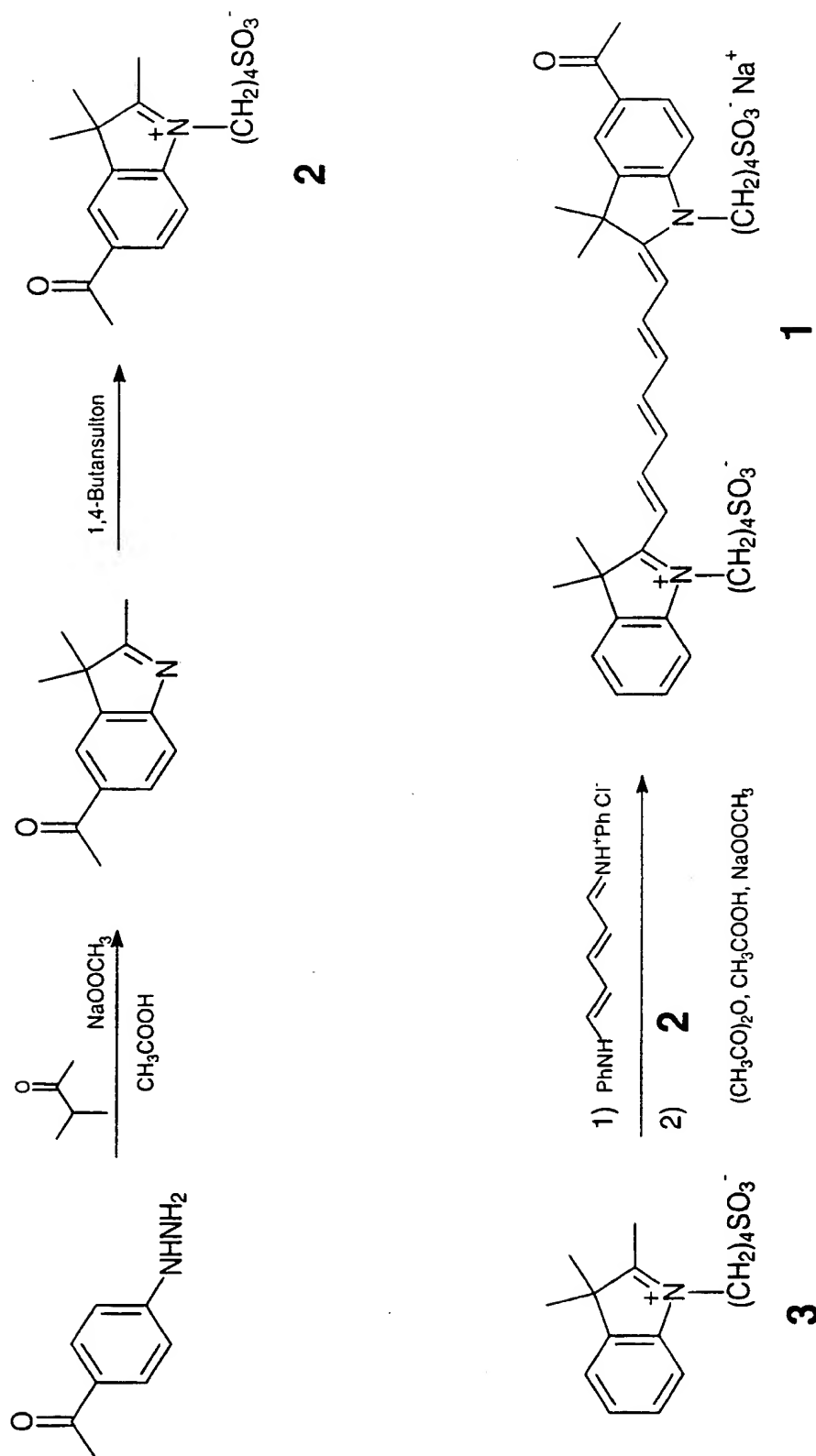
25

welche eine enzymatisch spaltbare chemische Bindung enthält.

- 5 8. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) L für eine Struktur steht, die durch Kathepsine, Peptidasen, Carboxypeptidasen, α - und β -Glykosidasen, Lipasen, Phospholipasen, Phosphatasen, Phosphodiesterasen, Proteasen, 10 Elastasen, Sulfatasen, Reduktasen und bakterielle Enzyme gespalten wird.
- 15 9. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) A und/oder B für einen Antikörper, deren Konjugate und Fragmente, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, natürliche oder synthetische Ribonukleinsäuren oder 20 Desoxyribonukleinsäuren oder deren chemische Modifikationen, wie Aptamere oder Antisenseoligonukleotide, Lipoproteine, Lectine, Kohlenhydrate, Mono-, Di- oder Trisaccharide, lineare oder verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder 25 -saccharidderivate oder für ein Dextran steht.
- 30 10. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) D für Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polylysin oder Polylysin-Dendrimere oder deren Derivate steht.
- 35 11. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 1 zur In-vivo-Diagnostik erkrankter Gewebebereiche mittels NIR-Strahlung sowie zur Therapie erkrankter Gewebebereiche.

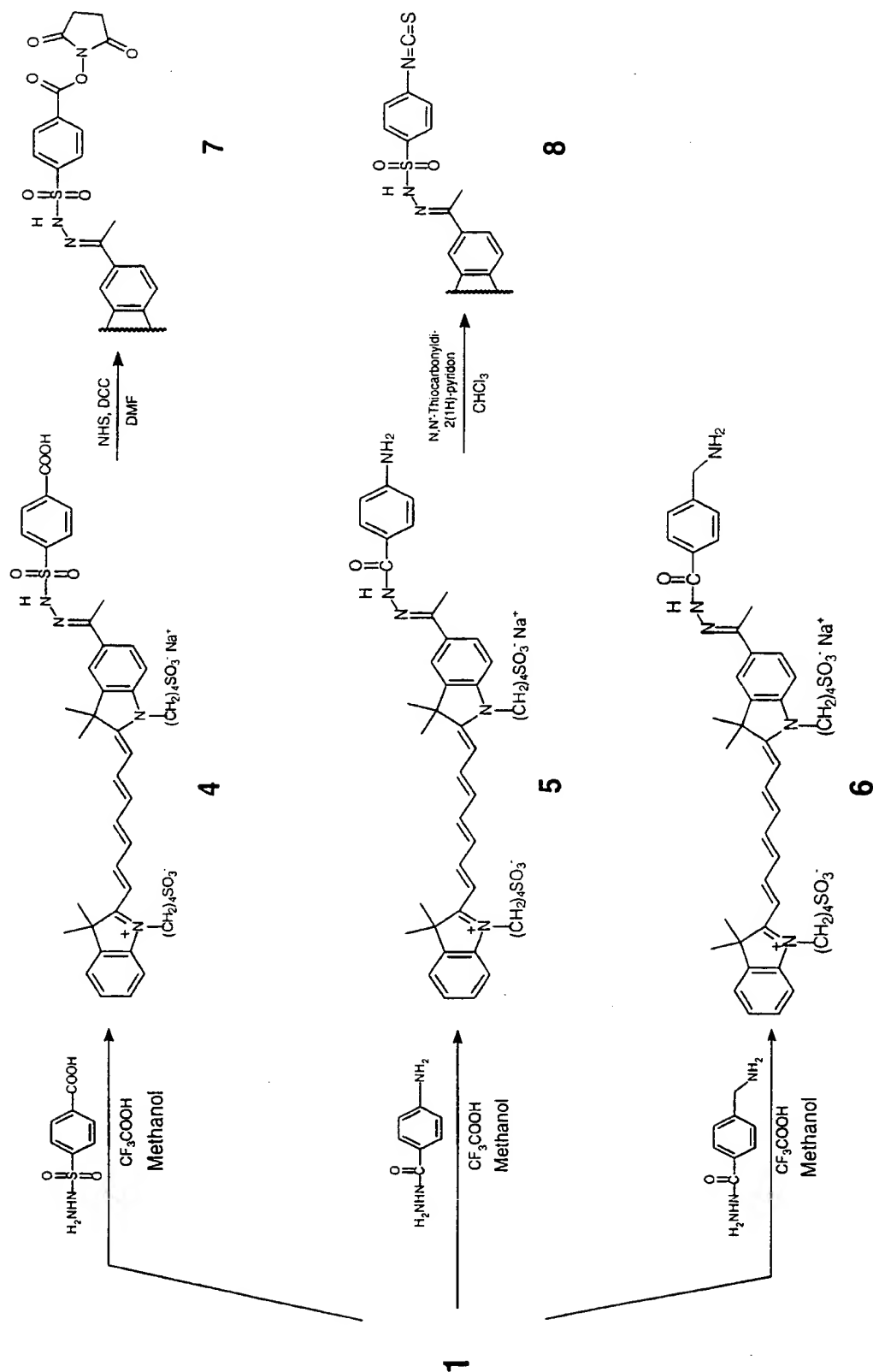
- 5 12. Optisches Diagnostikum zur In-vivo-Diagnostik erkrankter Gewebereiche mittels NIR-Strahlung, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Verbindung nach Anspruch 1 zusammen mit den üblichen Hilfs- und /oder Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln enthält.

1/8

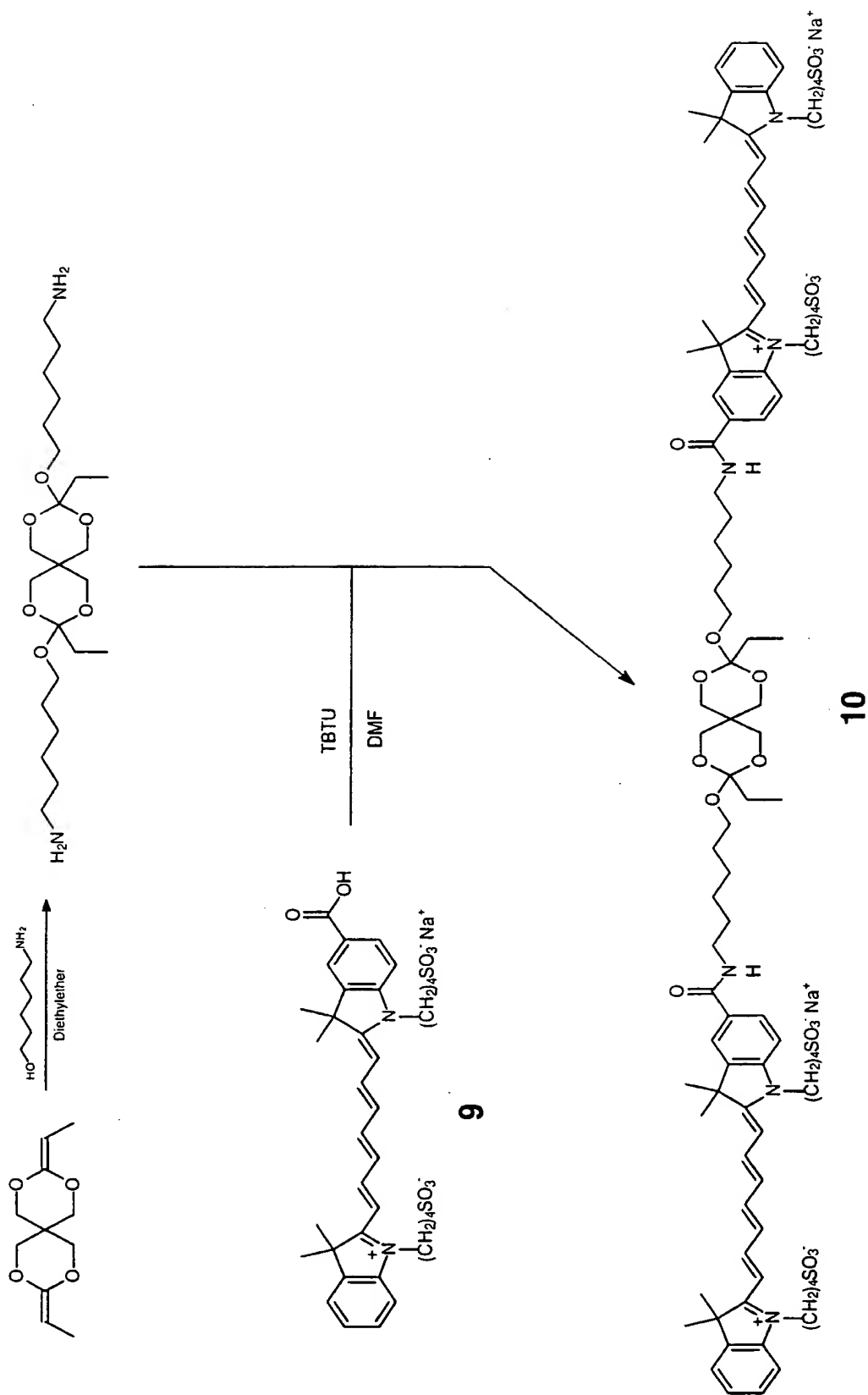


Figur 1

2 / 8

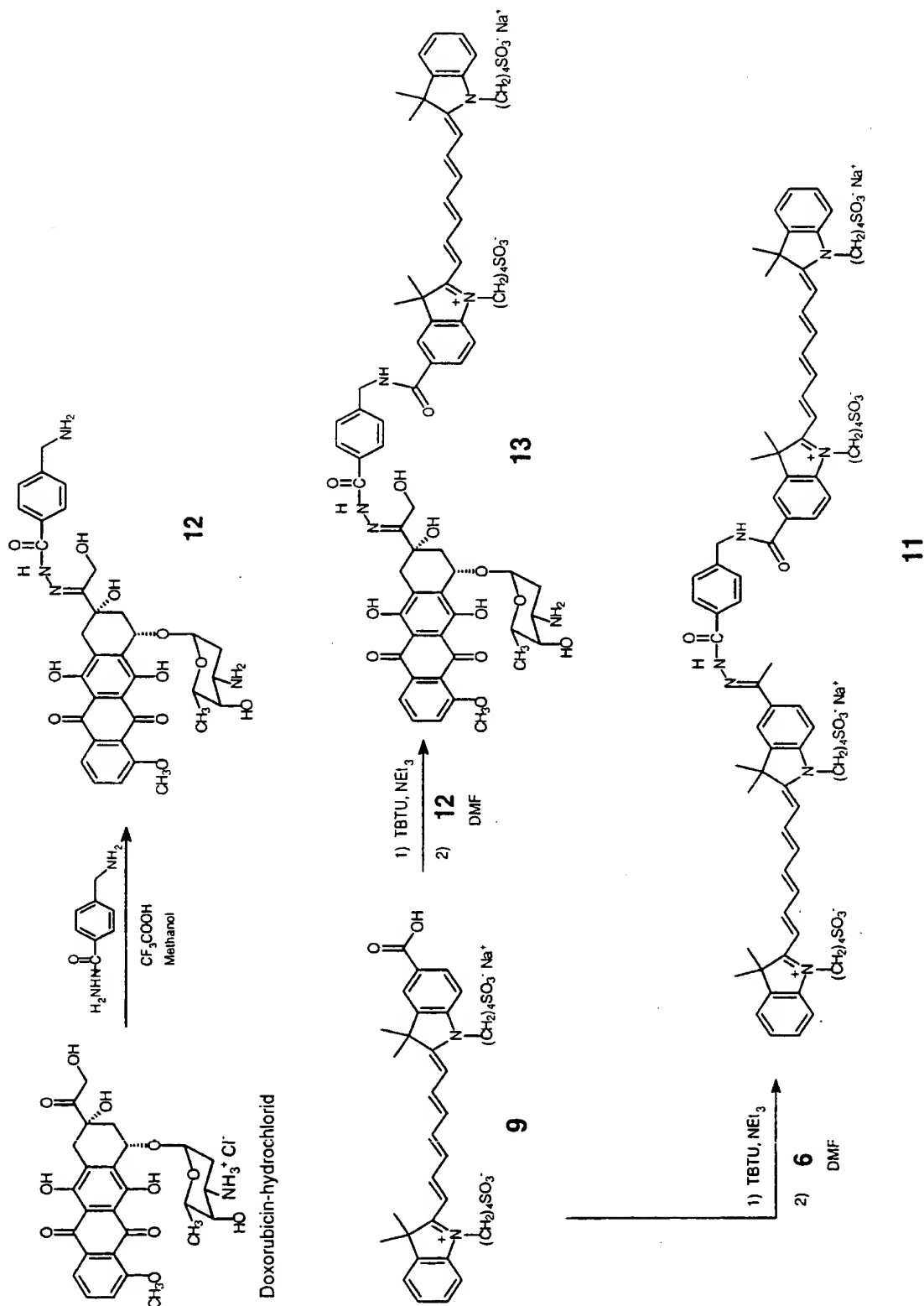


Figur 2



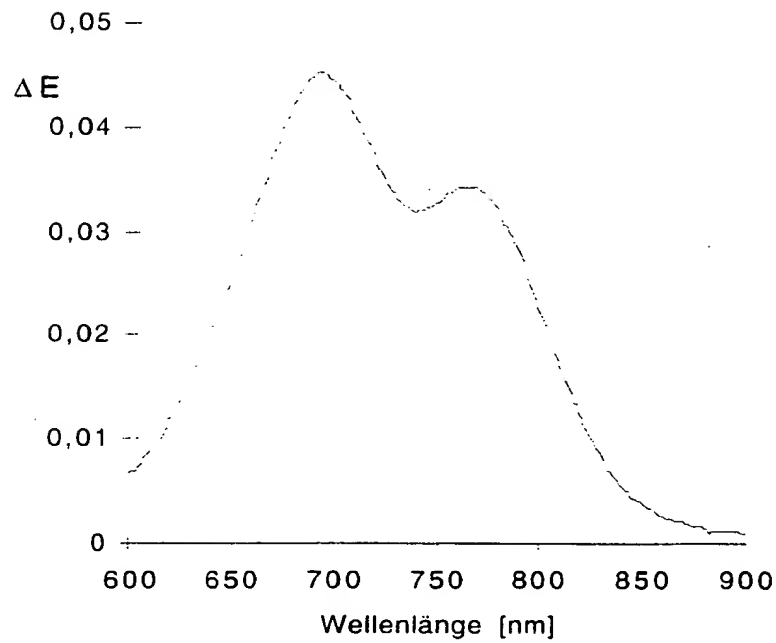
Figur 3

4 / 8



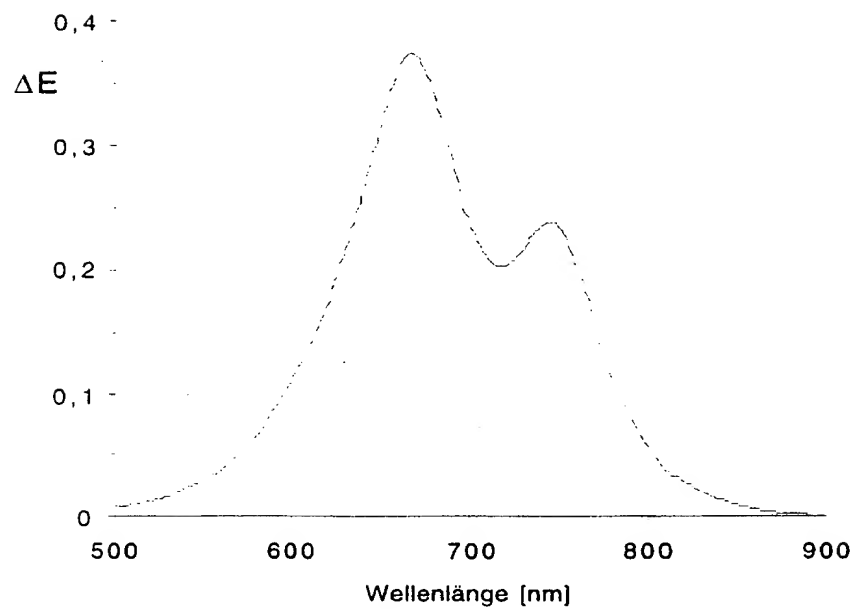
Figur 4

5 / 8



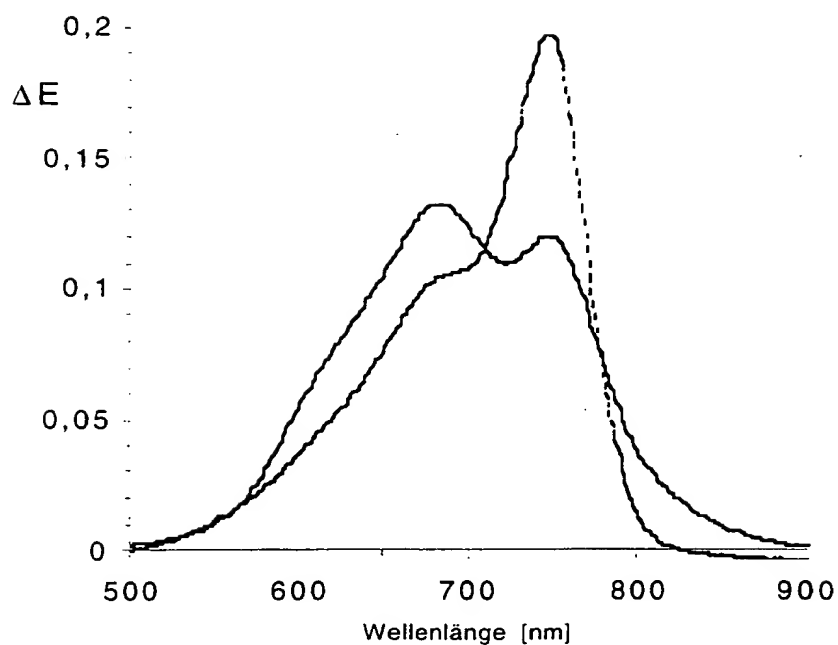
Figur 5 VIS/NIR-Absorptionsspektrum von mAK9.2.27 / 4-Konjugat
(siehe Beispiel 4.1) in Phosphatpuffer pH 7,8

6 / 8

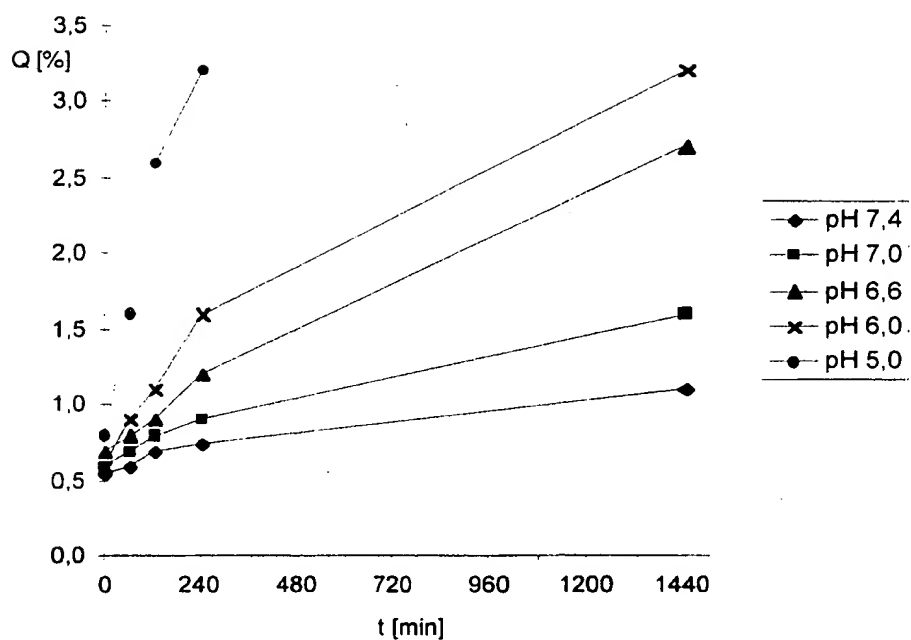


Figur 6 VIS/NIR-Absorptionsspektrum **10** (siehe Beispiel 5.1),
5 $\mu\text{mol/l}$ in Phosphatpuffer pH 8

7 / 8



Figur 7 VIS/NIR-Absorptionsspektrum von **11**
(siehe Beispiel 5.2),
Konzentration 4 $\mu\text{mol/l}$;
— in Phosphatpuffer pH 8,0;
---- in Phosphatpuffer pH 6,0 nach 24 h bei 37°C



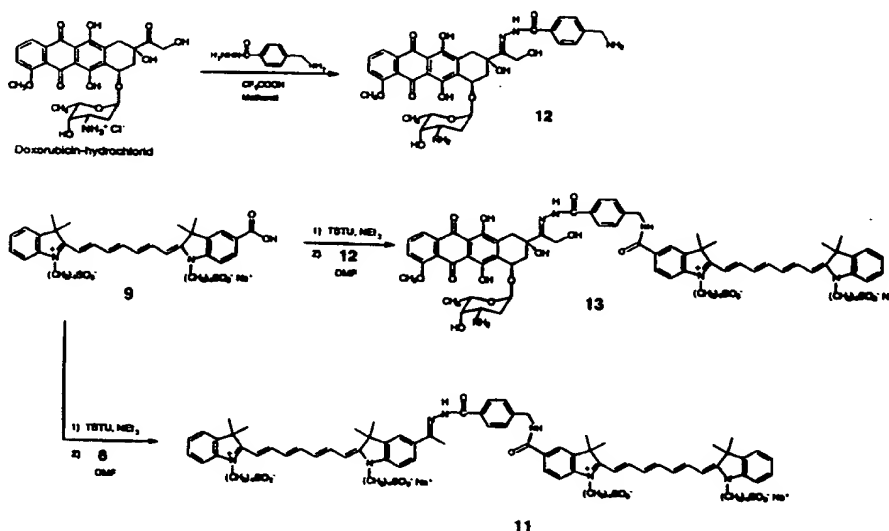
Figur 8 Beobachtung der Spaltung des säurelabilen Dimers **11** anhand des Anstiegs Fluoreszenzquantenausbeute bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von der Zeit (siehe Beispiel 6).



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 41/00, 49/00	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/47538 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01001 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. April 1998 (02.04.98) (30) Prioritätsdaten: 197 17 904.5 23. April 1997 (23.04.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHA, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Weverstrasse 51, D-13595 Berlin (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Jahnstrasse 17, D-13467 Berlin (DE). WRASIDLO, Wolfgang [DE/DE]; Knausstrasse 14, D-14193 Berlin (DE). (74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 21. Januar 1999 (21.01.99)

(54) Title: ACID-LABILE AND ENZYMATICALLY DIVISIBLE DYE COMPOUNDS FOR DIAGNOSIS WITH NEAR INFRARED LIGHT AND FOR THERAPY

(54) Bezeichnung: SÄURELABILE UND ENZYMATISCH SPALTBARE FARBSTOFFKONSTRUKTE ZUR DIAGNOSTIK MIT NAHINFRAROTLICHT UND ZUR THERAPIE



(57) Abstract

The invention relates to acid-labile and enzymatically divisible compounds for in-vivo and in-vitro diagnosis by means of near infrared radiation (NIR-radiation), the use of said compounds as optic diagnostic and therapeutic agents, and the diagnostic agents containing said compounds.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft säurelabile und enzymatisch spaltbare Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro-Diagnostik mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung), die Verwendung dieser Verbindungen als optische Diagnostika und Therapeutika und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatic Application No

PCT/DE 98/01001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K41/00 A61K49/00

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 476 408 A (BRUNSWICK CORP) 25 March 1992 see column 3, line 30-50 see column 4, line 35 - line 49-51; claims 3,6,9,12 ---	1-12
X	WO 96 17628 A (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST ;LICHA KAI (DE); RIEFKE BJOERN (DE); SEMM) 13 June 1996 see abstract see page 26; claim 5 ---	1-12
Y	---	1-12
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 095, no. 009, 31 October 1995 & JP 07 145148 A (BIO SENSOR KENKYUSHO:KK), 6 June 1995 see abstract; figures 2-5 ---	1-12
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 October 1998

Date of mailing of the international search report

22/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gonzalez Ramon, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/01001

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 175 617 A (CYTOGEN CORP) 26 March 1986 see page 38 see page 45-47; claims 2,7,10,16,35,39; example 11 ---	1-12
E	WO 98 22146 A (LICHA KAI ;RIEFKE BJOERN (DE); DYRK THOMAS (DE); TURNER JONATHAN) 28 May 1998 see page 14-15; claim 10 see abstract ---	1-12
X	WO 97 13490 A (LICHA KAI ;RIEFKE BJOERN (DE); HELDMANN DIETER (DE); DIAGNOSTIKFOR) 17 April 1997 see page 7-9; claims 5-8,10,11 ---	1-12
X	LICHA, KAI ET AL: "Synthesis and characterization of cyanine dye - poly(ethylene glycol) conjugates as contrast agents for in vivo fluorescence imaging" PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1998, 3196, 98-102, XP002079471 see abstract; figure 2 ---	1-12
X,P	EP 0 800 831 A (DAIICHI PURE CHEMICALS CO LTD) 15 October 1997 see page 3-5 see page 7, line 20-24 see page 8, line 20-30; claims 4,18,20,23 ---	1-5,9-12
X	LICHA, K. ET AL: "Synthesis and characterization of cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging" PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1996, 2927, 192-198, XP002079648 see abstract; figure 3 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 98/01001

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11 & 12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although the Claim(s) relate(s) to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internatio. pplication No

PCT/DE 98/01001

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0476408	A	25-03-1992	CA 2048089 A	18-03-1992
			JP 5238951 A	17-09-1993
WO 9617628	A	13-06-1996	DE 4445065 A	13-06-1996
			AU 3740995 A	26-06-1996
			CA 2205906 A	13-06-1996
			CN 1174511 A	25-02-1998
			EP 0796111 A	24-09-1997
			HU 77378 A	28-04-1998
			NO 972509 A	02-06-1997
			ZA 9509707 A	29-05-1996
EP 0175617	A	26-03-1986	US 4867973 A	19-09-1989
			AU 3016189 A	13-07-1989
			AU 583854 B	11-05-1989
			AU 4807185 A	08-04-1986
			CA 1326834 A	08-02-1994
			DE 3584559 A	05-12-1991
			DK 218386 A	11-07-1986
			JP 62500175 T	22-01-1987
			US 4950738 A	21-08-1990
			WO 8601720 A	27-03-1986
			US 5162512 A	10-11-1992
			US 5156840 A	20-10-1992
			US 5140104 A	18-08-1992
WO 9822146	A	28-05-1998	DE 19649971 A	28-05-1998
			AU 7298598 A	10-06-1998
WO 9713490	A	17-04-1997	DE 19539409 A	17-04-1997
			AU 1589297 A	30-04-1997
			EP 0854732 A	29-07-1998
			NO 981586 A	07-04-1998
EP 0800831	A	15-10-1997	AU 4497096 A	21-08-1996
			NO 973484 A	30-09-1997
			CA 2211470 A	08-08-1996
			JP 9127115 A	16-05-1997
			WO 9623525 A	08-08-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatio. : Aktenzeichen

PCT/DE 98/01001

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K41/00 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 476 408 A (BRUNSWICK CORP) 25. März 1992 siehe Spalte 3, Zeile 30-50 siehe Spalte 4, Zeile 35 - Zeile 49-51; Ansprüche 3,6,9,12 ---	1-12
X	WO 96 17628 A (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST ;LICHIA KAI (DE); RIEFKE BJOERN (DE); SEMM) 13. Juni 1996 siehe Zusammenfassung siehe Seite 26; Anspruch 5 ---	1-12
Y		1-12
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 095, no. 009, 31. Oktober 1995 & JP 07 145148 A (BIO SENSOR KENKYUSHO:KK), 6. Juni 1995 siehe Zusammenfassung; Abbildungen 2-5 ---	1-12
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Oktober 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/10/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gonzalez Ramon, N

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 175 617 A (CYTOGEN CORP) 26. März 1986 siehe Seite 38 siehe Seite 45-47; Ansprüche 2,7,10,16,35,39; Beispiel 11 ---	1-12
E	WO 98 22146 A (LICHIA KAI ;RIEFKE BJOERN (DE); DYRKIS THOMAS (DE); TURNER JONATHAN) 28. Mai 1998 siehe Seite 14-15; Anspruch 10 siehe Zusammenfassung ---	1-12
X	WO 97 13490 A (LICHIA KAI ;RIEFKE BJOERN (DE); HELDMANN DIETER (DE); DIAGNOSTIKFOR) 17. April 1997 siehe Seite 7-9; Ansprüche 5-8,10,11 ---	1-12
X	LICHIA, KAI ET AL: "Synthesis and characterization of cyanine dye - poly(ethylene glycol) conjugates as contrast agents for in vivo fluorescence imaging" PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1998, 3196, 98-102, XP002079471 siehe Zusammenfassung; Abbildung 2 ---	1-12
X,P	EP 0 800 831 A (DAIICHI PURE CHEMICALS CO LTD) 15. Oktober 1997 siehe Seite 3-5 siehe Seite 7, Zeile 20-24 siehe Seite 8, Zeile 20-30; Ansprüche 4,18,20,23 ---	1-5,9-12
X	LICHIA, K. ET AL: "Synthesis and characterization of cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging" PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1996, 2927, 192-198, XP002079648 siehe Zusammenfassung; Abbildung 3 -----	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01001

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 11 & 12
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche)
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefodert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

International - Aktenzeichen -

PCT/DE 98/01001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0476408	A	25-03-1992	CA	2048089 A	18-03-1992
			JP	5238951 A	17-09-1993
WO 9617628	A	13-06-1996	DE	4445065 A	13-06-1996
			AU	3740995 A	26-06-1996
			CA	2205906 A	13-06-1996
			CN	1174511 A	25-02-1998
			EP	0796111 A	24-09-1997
			HU	77378 A	28-04-1998
			NO	972509 A	02-06-1997
			ZA	9509707 A	29-05-1996
EP 0175617	A	26-03-1986	US	4867973 A	19-09-1989
			AU	3016189 A	13-07-1989
			AU	583854 B	11-05-1989
			AU	4807185 A	08-04-1986
			CA	1326834 A	08-02-1994
			DE	3584559 A	05-12-1991
			DK	218386 A	11-07-1986
			JP	62500175 T	22-01-1987
			US	4950738 A	21-08-1990
			WO	8601720 A	27-03-1986
			US	5162512 A	10-11-1992
			US	5156840 A	20-10-1992
			US	5140104 A	18-08-1992
WO 9822146	A	28-05-1998	DE	19649971 A	28-05-1998
			AU	7298598 A	10-06-1998
WO 9713490	A	17-04-1997	DE	19539409 A	17-04-1997
			AU	1589297 A	30-04-1997
			EP	0854732 A	29-07-1998
			NO	981586 A	07-04-1998
EP 0800831	A	15-10-1997	AU	4497096 A	21-08-1996
			NO	973484 A	30-09-1997
			CA	2211470 A	08-08-1996
			JP	9127115 A	16-05-1997
			WO	9623525 A	08-08-1996